

## クロロフィルの分解について

田口 裕\*

この研究は、まず、ペーパークロマトグラフィーにより分離した植物色素について、分光光度法を用いて色素の同定をおこない、黄葉や紅葉中のクロロフィルの自然変化を考察し、つぎに、クロロフィル抽出液を加熱したり、光を照射したときの分解について実験をおこなったものである。その結果、イチョウの半黄葉では、クロロフィルaが消失していることが確認された。また、加熱したとき、クロロフィルは、常緑葉より黄葉や紅葉する方が分解しやすく、クロロフィルaはクロロフィルbより分解がはやいという傾向が認められた。

### 1 はじめに

植物色素の分離は、中学校では化学分野の「物質の分離」で活用され、高等学校では光合成との関連において、生物の基礎実験として教材化されている。最近においては、ペーパークロマトグラフィーの<sup>1)</sup>二次元法を利用した植物色素の分離や分離性にすぐれた薄層クロマトグラフィーを用いた研究などが報告されている。しかし、葉組織中における色素変化や抽出の際にみられる色素の分解およびその生成物の検討などに、なお若干の問題を残している。

ここでは、ペーパークロマトグラフ法を用いてクロロフィルを単離し、 $R_f$ 値や吸収曲線によってそれを同定し、さらに、黄葉や紅葉期におけるクロロフィルの自然変化、加熱や光による退色現象などについて検討した。試みた実験のいくつかは、生徒実験としても充分行なえるものと思われる。以下、その概略について報告する。

### 2 色素の抽出と分離および同定

つぎの(1)～(3)により、植物色素を抽出し、クロロフィルa、bおよびその分解生成物を分離した。また、このクロロフィル抽出液は、後述する加熱や光によるクロロフィルの分解実験の試料とした。

#### (1) 試料の抽出

新鮮な葉10gを85℃の熱湯中に3分間浸し、それを乳鉢に移して炭酸カルシウムを1～2g加えて軽くすりつぶす。最終濃度が80～85%になるようにアセトンを加えて色素を抽出する。つぎに、遠心分離(300rpm 5～10分)によって抽出液と残渣とに分ける。抽出液は分液ロートに移し約40mlのエチルエーテルを加えて激しく振とうする。しばらく放置した後、水を静かに注いで脂溶性色素をエーテル層に移行させる。エーテル層に溶けこんでいる水分は、無水硫酸ナトリウムを2～3g加えて除去し、暗室で濃縮したものを試料溶液にする。なお、使用した植物葉はニセアカシヤ、イチョウ、モミジ、ホウレンソウの4種類である。

\* 理科長期研修員(三条市立理科教育センター 三条市立裏館小学校)

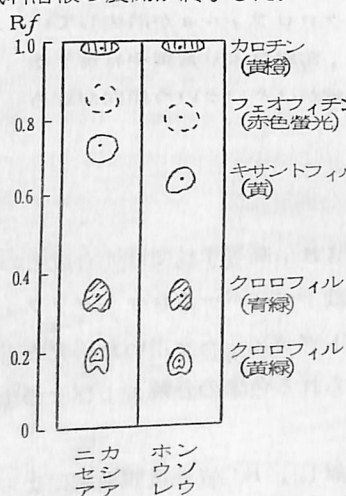
## (2) 色素の分離

ろ紙(東洋ろ紙 No. 50,  $2\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ )に試料溶液を毛细管ピペットを使ってスポイトし, 石油ベンジンとアセトンの混合溶液(10:1)を使って約60分間展開する。また, 分光光度計の検液とする場合は, かなりの量のクロロフィルを必要とするので, 10本のろ紙に約0.5 mlの試料溶液を带状に塗布して展開する。展開が終了したらろ紙を短時間で乾燥する。

## (3) 色素の同定

### Rf 値による方法

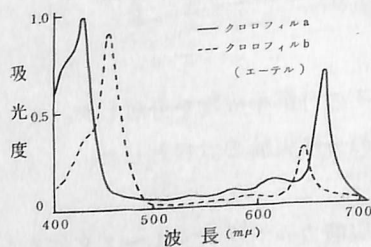
試料溶液の展開が終了したクロマトグラムの各スポットについて Rf 値(原点から展開した試料の中心までの距離と原点から溶媒浸透先端までの距離の比の値)を求めた(図1)。なお, Rf 値は温度や濃度および試料溶液中に残っている水分によってもかなり異なるが展開された各色素の順序は変わらない。クロロフィル a および b は Rf 値のほか, スポットの色調や紫外線による赤色蛍光などから総合的に判定した。



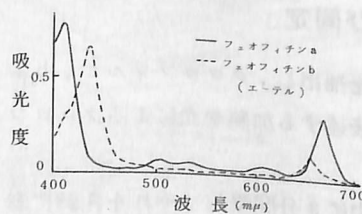
(図1) 分離色素の Rf 値

### 吸収曲線による方法

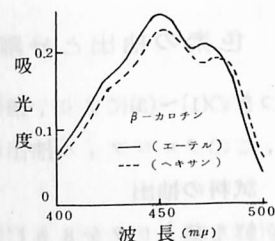
クロマトグラムから Rf 値およびスポットの色調や蛍光をもとにして, クロロフィル a, b およびクロロフィルの分解生成物と考えられるスポットをはさみで正確に切り取り, 一定量のエチルエーテルに溶出する。つぎに, エチルエーテルを対照液として, 分光光度計(日立 MODEL 101)で可視部(400~700 mμ)の吸収曲線(図2, 3)を作成した。得られた吸収曲線は文献値と照合して同定した。



(図2) クロロフィル a, b の吸収曲線



(図3) フェオフィチン a, b の吸収曲線



(図4) β-カロチンの吸収曲線

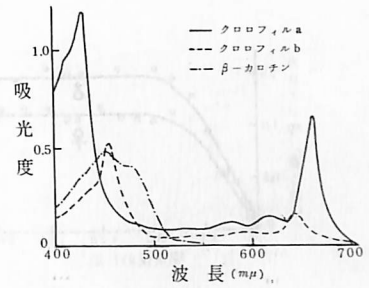
## 3 クロロフィルの分解

### (1) 黄葉, 紅葉中のクロロフィルの分解

すでに述べた2の(1)~(3)の方法で, 黄葉や紅葉中のクロロフィルの変化を調べた。以下, その結果について述べる。

### ニセアカシア

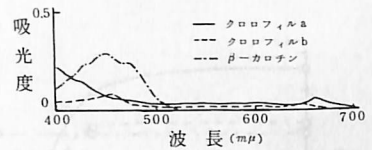
緑葉では、クロマトグラム上にクロロフィルaおよびbのスポットがあり、紫外線を照射するとクロロフィルaが分解してできたフェオフィチンaの赤色蛍光が認められた。(図5, 6)は、緑葉と黄葉中のクロロフィルa, bおよびβ-カロチン(後述するクロロフィルaおよびbの減少度合を比較するためにβ-カロチンの吸収曲線が必要になってくる)の吸収曲線である。黄葉になると、クロロフィル量は緑葉と比較して激減しており、スポットの色調も緑葉のそれより大変薄いものになってきている。また、緑葉や半黄葉のクロマトグラムに認められたフェオフィチンaのスポットは消失していた。



(図5) 緑葉中のクロロフィルとβ-カロチンの吸収曲線

### イチョウ

緑葉では、クロマトグラム上にクロロフィルa, bおよびフェオフィチンaのスポットが認められるが、半黄葉になるとクロロフィルaは認められなくなり、少量のクロロフィルbとフェオフィチンaと思われるスポットだけが認められた。吸収曲線では、緑葉、半黄葉ともクロロフィルbの吸収極大の位置は一致している。しかし、フェオフィチンaと思われるものの吸収曲線はフェオフィチンaと比較すると、短波長部に変化が起きている。黄葉では、クロロフィルa, bおよびフェオフィチンaのスポットは全く認められず; 紫外線による反応も表われなかった。



(図6) 黄葉中のクロロフィルとβ-カロチンの吸収曲線

モミジ

緑葉では、クロマトグラム上にクロロフィルa, bおよびフェオフィチンaのスポットが認められるが、黄葉になるとクロロフィルaおよびbのスポットの色調は薄くなり、フェオフィチンaは認められなくなった。吸収曲線でもクロロフィルaおよびbの吸光度は低くなっている。紅葉では、クロマトグラム上にクロロフィルa, bおよびフェオフィチンaのスポットが認められ、吸収曲線における吸収極大の位置は、いずれも緑葉の場合と一致している。しかし、クロロフィルaおよびbの吸光度は低くなっている。

### 考察

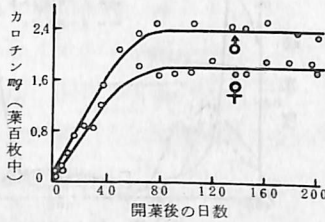
黄葉期におけるクロロフィルは急速に分解する。これは、ニセアカシアやイチョウなどのクロマトグラムにみられるスポットの濃淡や吸収曲線の吸光度からも推定できる。イチョウにおいては、半黄葉ですでにクロロフィルaが消失しており、黄葉になるとクロロフィルは全く消失してしまう。また、どの緑葉の抽出液中にもフェオフィチンaは認められたがフェオフィチンbは認められなかった。これらから、クロロフィルaは、クロロフィルbより分解しやすい色素であるといえる。

### 参考文献

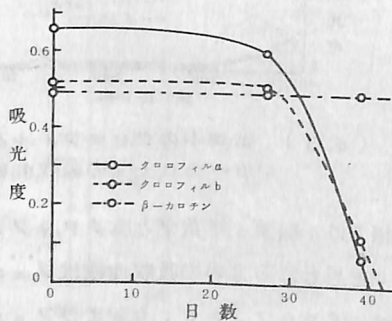
黄葉期におけるクロロフィルは急速に分解する。これは、ニセアカシアやイチョウなどのクロマトグラムにみられるスポットの濃淡や吸収曲線の吸光度からも推定できる。イチョウにおいては、半黄葉ですでにクロロフィルaが消失しており、黄葉になるとクロロフィルは全く消失してしまう。また、どの緑葉の抽出液中にもフェオフィチンaは認められたがフェオフィチンbは認められなかった。これらから、クロロフィルaは、クロロフィルbより分解しやすい色素であるといえる。

カロチンを基準としたクロロフィルaおよびbの減少度合

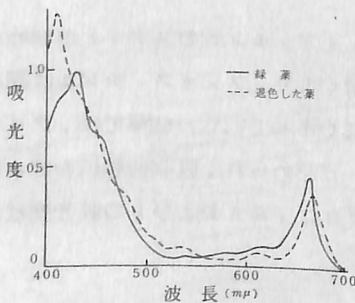
文献<sup>4)</sup>によれば、ヤナギは黄葉期においてクロロフィルの減少がみられるが、カロチンの含量は開葉から落葉にいたるまで変化が起っていないことが報告されている(図7)。他の植物の黄葉期において



(図7) ヤナギのカロチンの消長



(図8) クロロフィル a, b の減少度合



(図9) イチョウの抽出液の吸収曲線

もカロチンの含量に変化がないものと仮定すれば、カロチンを基準にしてクロロフィルの減少度合を知ることができよう。このことをニセアカシアの緑葉、半黄葉、黄葉の3時期の吸収曲線を用いて検討してみた。 $\beta$ -カロチンの各時期の吸光度は、分離の際の抽出液のスポット量の多少によって違いがある。しかし、スポット量の多少は、各時期の葉中に含まれる各色素の割合に影響しない。そこで、半黄葉と黄葉の450 m $\mu$ における $\beta$ -カロチンの吸光度を緑葉の同波長の吸光度に合わせ、各時期における色素の吸光度比を使ってクロロフィル a (663 m $\mu$ ) および b (455 m $\mu$ ) の吸光度を換算した。(図8)は、このようにして求めたクロロフィルの減少度合である。なお、日数は、緑葉の色素抽出日を基準にして、半黄葉、黄葉とそれぞれの色素抽出日をとってある。この図からも、クロロフィルの減少傾向やクロロフィル a の分解がクロロフィル b よりはやいことが予測される。

なお、カロチンの同定は、つぎのようにしておこなった。2の(2)の方法で得られたクロマトグラムで、R<sub>f</sub> 値からカロチンと思われるスポットの色素をヘキサンおよびエチルエーテルに溶出し、その吸収曲線における吸収極大の位置から $\beta$ -カロチンであることを確認した(図4)。

## (2) 加熱によるクロロフィルの分解

### 葉組織中での分解

操作：イチョウの緑葉を85℃の熱湯にかっ色に変化するまで浸す。つぎに、2(1)と同じ方法で色素を抽出し、その液を用いて吸収曲線をつくり、緑葉のものと比較する。

同様に、ホウレンソウの葉を沸騰水に30分間浸してその抽出液の吸収曲線をつくり、加熱しないものと比較する。

### 結果と考察

イチョウの緑葉は、加熱によって短時間でかっ色に変化する。その色素抽出液の吸収曲線を緑葉のものと比較してみると緑葉の430 m $\mu$ と663 m $\mu$ の波長における吸収極大はクロロフィル a のものであるが、かっ色に変化した葉の吸収極大は410 m $\mu$ と665 m $\mu$ で、クロロフィル a ののものと一致しない。これは、明らかに、加熱によってクロロフィルが分解して、他の物質に変化したものといえる。

ホウレンソウは、85℃の熱湯に短時間浸しただけでは退色しないが、沸騰水に長時間浸すと退色する。吸収曲線では、イチョウほど顕著ではないが、短波長部の吸収極大の位置が変化している。また、



紫外線照射により赤色蛍光を呈するクロロフィル以外の2つのスポットがみられた。これは、吸収曲線からフェオフィチンaおよびbであることが確認できた。

これらのことから、葉組織中のクロロフィルは、加熱によって分解されフェオフィチンになることが確認できた。イチョウやモミジのように黄葉や紅葉するものは、加熱によるクロロフィルの分解がはやいので、すぐに退色現象を起こすといえる。

#### 抽出液中での分解

操作：ハウレンソウの色素抽出液 10 ml を2本の試験管に5 ml ずつ分ける。1本はすぐにその吸収曲線を求めるが、他の1本はゴム管のついたせんをして周囲を黒い紙でおおい光による分解を避けて沸騰水中に30分間浸す。エチルエーテルは気化し、色素は試験管の底で乾固されるが、もとと同じ容量のエチルエーテルを加えて吸収曲線をつくり、加熱しないものと比較する。

つぎに、抽出液から分離したクロロフィルaおよびbのエーテル溶液についても、上記と同じ方法で吸収曲線をつくり、加熱しないものと比較する。

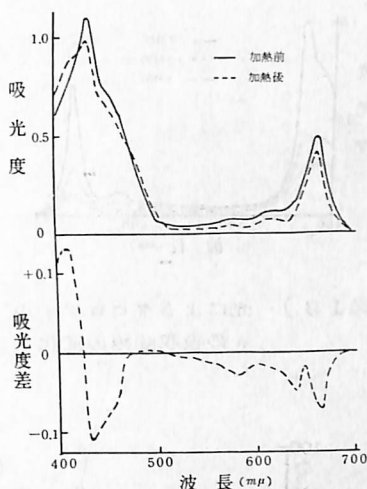
#### 結果と考察

抽出液の加熱したものと加熱しないものとの吸収曲線を比較すると、各波長の吸光度に増減がみられる(図10)。その吸光度差をみると、クロロフィルaの減少が目立ち、逆にフェオフィチンaの生成がみられる。

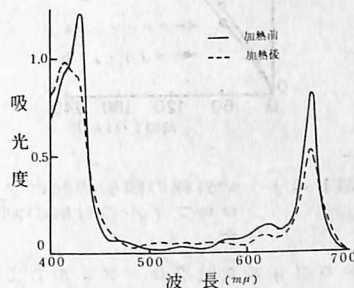
クロロフィルaのエーテル溶液を加熱したものでは、吸収極大の吸光度は減少しており、フェオフィチンaの増加がみられる(図11)。クロロフィルbの吸収極大の位置は一致しているが、吸収極大の吸光度は減少している(図12)。紫外線照射によりフェオフィチンbと思われる赤色蛍光のスポットが認められた。このように、抽出液中でも加熱によってクロロフィルが分解してフェオフィチンに変化することがわかった。しかし、一部のクロロフィルはフェオフィチン以外のものにも分解し、この物質も紫外線により赤色蛍光を呈することが判明した。このことは葉組織中ではみられなかったことであり、その物質を同定することはできなかった。

#### (3) 光によるクロロフィルの分解

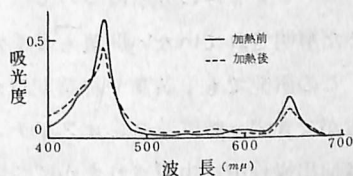
操作：クロロフィルaおよびbのエーテル溶液をそれぞれ5 ml ずつ試験管に取りせんをする。エチル



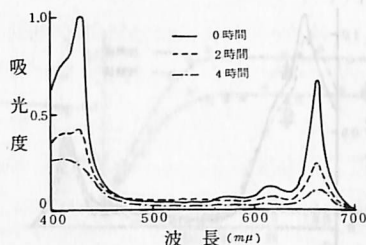
(図10) ハウレンソウの抽出液の吸収曲線



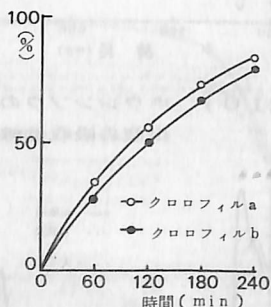
(図11) クロロフィルaの吸収曲線の変化



(図12) クロロフィルbの吸収曲線の変化



(図13) 光によるクロロフィル a の吸収曲線の変化



(図14) 紫外線の照射時間とクロロフィルの分解の割合

クロロフィル a はクロロフィル b より分解する割合がやや大きいといえる。

#### 4 おわりに

クロロフィルの分解については、生物学の分野で多くの専門的な研究が報告されている。しかし、いまだ解明されていない問題も多く残されている。

この研究でも、黄葉や紅葉期のクロロフィル量の減少や色素抽出時における分解等については充分検討ができず、特に、フェオフィチンが葉組織中において自然の状態では分解されて生じたものか、あるいは抽出操作中に生成されたかについては明らかにすることはできなかった。この問題を究明することは今後の課題でもある。

#### 文 献

- 1) 中野 昭, 小山博夫: 科学の実験, Vol121, №12 (1970) PP.48-53
- 2) 広田耕三, 黒田健次: 科学の実験, Vol123, №11 (1972) PP.59-65
- 3) 小原哲二郎ほか編: 食品分析ハンドブック, 建帛社 (1969) PP.339-359
- 4) 富堅 裕: 紅葉のナゾをさぐる, 国土と教育, №3 (1970) PP.26-28
- 5) 清水 碩: クロロフィルの分解, 生物科学, Vol123, №1 (1971) PP.31-41
- 6) 柴田村治, 寺田喜久雄: ペーパークロマトグラフ法の実験, 共立出版, (1971)

エーテルの液面がわかるように試験管壁に印をつけて明るい所に放置する。吸収曲線を2時間ごとにつくる。測定の際には減少したエチルエーテルを印の所まで加えて濃度を一定にする。

つぎに、クロロフィルのエーテル溶液を分光光度計用のセルに注入して、暗室で溶液面から10 cm離れた真上から紫外線(殺菌燈GL-10を使用)を照射する。クロロフィル a は430 mμ, クロロフィル b は455 mμ の波長で吸光度を1時間ごとに測定する。測定の際には、セルから気化した分のエチルエーテルを加えて前と同じ容量で測定する。

なお、対照として、暗室で紫外線を照射しないで放置したもの吸光度も測定する。

#### 結果と考察

エチルエーテル中のクロロフィルは、光を当てると退色現象を起こして無色の物質に変化していく(図13)。図における430 mμ と663 mμ の波長における吸光度の減少は、クロロフィル a が光によって分解されて、他の物質に変化していくことを示している。このような光のはたらきは、多分に化学変化をもたらす紫外線にあるものと考えられる。(図14)は、クロロフィル a および b が紫外線の照射時間によって、どれだけ分解されるかその割合を表わしたものである。これによれば